

Нейропротективные свойства производного фурана — соединения ГИЖ-276 на модели геморрагического инсульта

Литвинова С.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А., Кутепова И.С., Жмуренко Л.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Целью настоящего исследования было изучение нейропротективных свойств нового оригинального соединения ГИЖ-276 с биохимической оценкой его влияния на активность ферментов пролилэндепептидазы (ПЭП) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови крыс с посттравматической гематомой, моделью геморрагического инсульта. *Методика исследования:* моделирование геморрагического инсульта проведено с использованием методики создания интрацеребральной посттравматической гематомы с введением аутокрови в место повреждения. Флуориметрически, ультрафиолетовым методом проведено биохимическое исследование влияния ГИЖ-276 на активность ферментов ПЭП и ЛДГ в плазме крови крыс с ГИ. *Результаты исследования:* выявлено, что ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг (7 дней, внутрибрюшинно) оказывает выраженный нейропротективный эффект, ослабляя неврологический дефицит у крыс с геморрагическим инсультом через 24 ч, 7 и 14 сут. после операции и статистически достоверно увеличивая число выживших крыс к 14-м суткам наблюдения. Ослабление неврологического дефицита и гибели животных сопровождается снижением активности ферментов ЛДГ и ПЭП, что свидетельствует об улучшении обеспечения тканей мозга кислородом и уменьшении нейровоспаления. *Заключение:* защитный, нейропротективный эффект ГИЖ-276 на модели геморрагического инсульта может быть частично обусловлен его положительным влиянием на воспалительное и гипоксическое звено развития вторичных повреждений мозга при инсульте.

Ключевые слова: ГИЖ-276, геморрагический инсульт, ишемия, гипоксия, ЛДГ, ПЭП, нейровоспаление

Neuroprotective properties furan compounds GIZH-276 on the model of hemorrhagic stroke

Litvinova S.A., Zolotov N.N., Voronina T.A., Kutepova I.S., Zhmurenko L.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The study of the neuroprotective properties new original compound GIZH-276 and evaluate changes activities of prolyl endopeptidase (PEP) and lactate dehydrogenase (LDH) in blood plasma of rats with post-traumatic hematoma (model of hemorrhagic stroke) is the aim of this investigation. *Methodology of the study:* Modeling of hemorrhagic stroke (HS) was carried out using the creation of intracerebral post-traumatic hematoma with the introduction of autologous blood into the site of injury. Assay of enzymes activities in plasma was carried out with fluorescent (PEP) and ultraviolet (LDH) methods. *The results of the study:* GIZH-276 at dose of 10 mg/kg (7 days, intraperitoneally) has a pronounced neuroprotective effect, attenuating neurological deficits in rats with hemorrhagic stroke 24 hours, 7 and 14 days after surgery and statistically significantly increasing the number of surviving rats by 14 days of observation. The weakening of neurological deficit and death of animals is accompanied by decreased activity of enzymes LDH and PEP, which indicates the improvement of security of brain tissue oxygen and reducing neuroinflammation. *Conclusion:* Safety and neuroprotective effect of GIZH-276 on the model of hemorrhagic stroke may be partially due to positive effect on inflammatory and hypoxia during the development of secondary brain damage in stroke.

Keywords: GIZH-276, hemorrhagic stroke, ischemia, hypoxia, LDH, PEP, neuroinflammation

Автор, ответственный за переписку:

Литвинова Светлана Александровна – в.н.с., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», лаборатория психофармакологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел. +7 (495) 601-14-24; e-mail: sa_litvinova@mail.ru

Введение

Согласно современным представлениям, тяжесть течения инсульта определяется частотой и интенсивностью постинсультных осложнений, обусловленных ишемией, гипоксией и нейровоспалением. После образования некротических зон в течение первых нескольких часов после инсульта в тканях, испытывающих недостаток кровотока, увеличивается содержание нейропептидов, прямо пропорционально коррелирующих с тяжестью постинсультных осложнений [6]. Увеличение экспрессии и активности пролилэндепептидазы (ПЭП) в ишемизированном

мозге свидетельствует о развитии нейровоспаления в постинсультный период [5, 7], а накопление лактата приводит к сдвигу кислотно-щелочного равновесия и развитию гипоксии, что, в конечном итоге, способствует ещё большему увеличению инфарктных зон головного мозга [8].

Целью данного исследования явилось изучение нейропротективных свойств нового оригинального соединения производного фурана — ГИЖ-276 с биохимической оценкой его влияния на активность ПЭП и ЛДГ в плазме крови крыс с посттравматической гематомой (модель геморрагического инсульта).

Методы исследования

Перед проведением операций крыс наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг). Моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы — геморрагического инсульта у крыс осуществляли согласно Руководству по проведению доклинических исследований [1, 4]. При помощи бор-машины в стереотаксисе осуществляли трепанацию черепа в области capsula interna по координатам атласа Буреша для аутбредных крыс — L = 3,5 мм, A = 2 мм от брегмы и затем, используя специальное устройство (мандрен-нож), проводили деструкцию мозговой ткани на глубине — H = 4,5–5,0 мм с последующим введением в место повреждения крови, взятой из-под языка оперируемого животного в объёме 0,02–0,03 мл. Ложнооперированным животным проводили скальпирование и трепанацию черепа без деструкции мозговой ткани.

Животные были разделены на группы: 1-я — пассивный контроль, ложнооперированные (ЛО); 2-я — активный контроль, геморрагический инсульт (ГИ); 3-я — ГИЖ-276 10 мг/кг + ГИ. Животным групп ЛО и ГИ вводили физиологический раствор. Крысам 3-й группы вводили ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней внутрибрюшинно (в/б), с первым введением через 3 ч после операции.

Динамику развития неврологических нарушений по шкале Stroke-index McGrow в модификации Ганушкиной [3] и выживаемость крыс регистрировали через 24 ч, на 7-е и 14-е сутки после операции. Тяжесть неврологического дефицита определяли с использованием тестов «Перекладина» и «Вращающийся стержень» [2].

На 7-й день после операций у свободноподвижных крыс брали кровь из хвостовой вены. В плазме крови крыс флуориметрически определяли активность ПЭП. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, IU/L) определяли ультрафиолетовым методом с окисленным NAD и молочной кислотой.

Статистическую обработку проводили в программе «Биостат 6.0.» с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Фишера. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Геморрагический инсульт, созданный посттравматической гематомой с введением аутокрови в место повреждения, не вызвал через 24 ч гибели животных, но способствовал появлению животных с неврологическими нарушениями легкой и тяжелой симптоматики. Среди тяжелых неврологических нарушений отмечались парезы конечностей и манежные движения у 50% крыс, оцениваемые визуально и по неспособности животных удерживаться на вращающемся стержне со скоростью 10 об/мин. Среди легкой симптоматики наличествовали одно- и двусторонние полуптозы, вялость, замедленность движений, а также слабость конечностей у 58% животных, регистрируемая по неспособности подтянуться на перекладине (табл. 1).

С развитием постгеморрагических осложнений отмечалось нарастание гибели животных в критические дни постинсультной динамики — на 7-е и 14-е сутки после операции, что соответствовало 50 и 75% погибшим (табл. 2).

Гибель животных сопровождалась нарастанием неврологического дефицита на протяжении всего экспериментального исследования, который проявлялся парезами, параличами конечностей и манежными движениями у 66% животных на 7-е и 14-е сутки регистрации (см. табл. 1, 2).

У животных с ГИ соединение ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг при введении через 3 ч и далее в течение 6 дней ослабляло проявления неврологического дефицита, снижая число крыс с парезами конечностей и манежными движениями на 20% через 24 ч и на 38% — через 7 сут. после инсульта относительно ложно оперированных крыс. ГИЖ-276 ослаблял неврологические нарушения и после отмены соединения — к 14-у дню регистрации, уменьшая число животных с тяжелой симптоматикой на 33%. При этом, уменьшалось число погибших животных на 20 и 35% к 7- и 14-у дню регистрации относительно соответствующих показателей выживаемости крыс с ГИ без терапии (табл. 1, 2).

Таким образом, ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг при 7-кратном введении (в/б) защищал животных от ги-

Таблица 1

Влияние ГИЖ-276 на неврологический дефицит по шкале McGrow у крыс с геморрагическим инсультом (ГИ)

Группы животных	24 ч	7-е сутки	14-е сутки
Число крыс с тяжёлыми нарушениями: парезы конечностей, манежные движения			
ЛО	0/8	0/8	0/8
Активный контроль (ГИ)	6/12	4/6	2/3
ГИЖ-276 (10 мг/кг) + ГИ	3/10*	2/7	2/6
Число крыс с лёгкими нарушениями: одно- и двусторонние полуптозы, вялость, замедленность движений, слабость конечностей, полуптозы			
ЛО	1/8	1/8	0/8
Активный контроль (ГИ)	7/12	2/6	1/3
ГИЖ-276 (10 мг/кг) + ГИ	6/10	2/7	3/6

Примечание: * — достоверность отличий значений от контроля с ГИ при $p \leq 0,05$ (критерий Фишера).

Исследование влияния ГИЖ-276 на выживаемость у крыс с геморрагическим инсультом (ГИ)

Группы животных	Число животных	Доза, мг/кг	Число выживших крыс после операции, %		
			1 сутки	7 сутки	14 сутки
ЛО	8	—	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)
Активный контроль (ГИ)	12	—	100 (12/12)	50 (6/12)	25 (9/12)
ГИЖ-276 + ГИ	10	10	100 (10/10)	70 (7/10)	60 (6/10)*

Примечание: * — достоверность отличий значений от контроля с ГИ при $p \leq 0,05$ (критерий Фишера).

Таблица 3

Влияние ГИЖ-276 на активность ПЭП и уровень ЛДГ у крыс с геморрагическим инсультом (ГИ)

Группы животных	Кол-во животных	Доза, мг/кг	Активность ПЭП	Лактатдегидрогеназа в плазме (ЛДГ), IU/L
			7-е сутки	7-е сутки
ЛО	6	—	0,31±0,02	—
Активный контроль (ГИ)	6	—	0,41±0,01 [#]	103,52±10,19
ГИЖ-276 + ГИ	7	10	0,31±0,03*	58,43±10,38*

Примечание: [#] — достоверность отличий значений от группы ЛО, при $p \leq 0,05$ (критерий Манна–Уитни); * — достоверность отличий значений от группы активного контроля с ГИ, при $p \leq 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

бели на протяжении 14 дней, что сопровождалось ослаблением неврологического дефицита.

Исследование плазмы крови крыс животных с геморрагическим инсультом без терапии выявило развитие нейровоспаления и окислительного стресса, маркерами которых является повышение активности ПЭП и ЛДГ. Так, биохимическое исследование группы крыс с ГИ без терапии (активный контроль) на 7-е сутки после моделирования геморрагического

инсульта показало увеличение ($p \leq 0,05$) показателя активности ПЭП на 33% относительно значений ложно оперированных крыс (ЛО) (табл. 3). ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг в режиме 7-дневного введения статистически достоверно снижал повышенную активность ПЭП до значений группы ЛО и двукратно уменьшал активность фермента ЛДГ относительно животных активного контроля (табл. 3).

Заключение

Проведённые исследования показали, что соединение ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг /7 дней уменьшает неврологический дефицит у крыс с геморрагическим инсультом через 24 ч, 7 и 14 сут. после операции и статистически достоверно увеличивает число выживших крыс к 14-м суткам наблюдения. Биохимическое исследование плазмы крови крыс показало, что ослабление неврологического дефицита и гибели животных сопровождаются снижением активности ферментов ЛДГ и ПЭП, что свидетельствует об улучшении обеспечения тканей мозга кислородом и уменьшении нейровоспаления.

Таким образом, ГИЖ-276 обладает защитным, нейропротективным действием и положительно влияет на воспалительное и гипоксическое звено развития вторичных повреждений мозга при инсульте.

Литература

1. Воронина Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия, «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», Издание ФГБУ «НЦЭМСП» Минздрава России, Москва, 2012; 1 (17): 276–296.
2. Воронина Т.А., Середенин С.Б., Яркова М.А., Воронин М.В. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, М.: изд-во «Гриф и К» ФГБУ «НЦЭМСП» Минздрава России, 2012; 1 (14): 264–275.
3. Ганнушкина И.В. Патофизиологические механизмы нарушений мозгового кровообращения и новые направления в их профилактике и лечении. Журн. неврол. и психиатр. 1996; 1: 14–18.
4. Мирзоян Р.С., Плотникова М.Б., Ганьшина Т.С. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств

для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», Издание ФГБУ «НЦЭМСП» Минздрава России, М.: 2012; 1 (28): 480–487.

5. Männistö P.T., Venäläinen J., Jalkanen A., Garcia-Horsman, J.A. Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. Drug news & perspectives. 2007; 20 (5): 293–305.

6. Turner R.J., Vink R. The Role of Substance P in Ischaemic Brain Injury. Brain Sci. 2013; 3 (1): 123–142.

7. Röhnert P., Schröder U.H., Ziabreva I., Träger M., Reymann K.G., Striggow F. Insufficient endogenous redox buffer capacity may underlie neuronal vulnerability to cerebral ischemia and reperfusion. J Neurosci Res. 2012; 90 (1): 193–202.

8. Yoshimasa Takeda, Liang Zhao, Michael Jacewicz, William A Pulsinelli, and Thaddeus S Nowak, Jr // Metabolic and perfusion responses to recurrent peri-infarct depolarization during focal ischemia in the Spontaneously Hypertensive Rat: dominant contribution of sporadic CBF decrements to infarct expansion. J Cereb Blood Flow Metab. 2011; 31 (9): 1863–1873.